



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학석사 학위논문

Stearoyl-CoA Desaturase 2의 배아 척수 신경 발달에서의 역할

The role of Stearoyl-CoA Desaturase 2 in
development of embryonic spinal cord

2019년 8월

서울대학교 대학원

약학대학 약물학 전공

강 유 빈

초 록

Stearoyl-CoA desaturase 2의 배아 척수 신경 발달에서의 역할

강유빈

서울대학교 대학원

약학과 약물학 전공

Stearoyl-CoA desaturase 2(SCD2)는 마우스의 SCD 동위체 (isoform)중 하나로, 중추신경계에서 가장 많이 발현하며 마우스 배아의 발달에도 중요하다고 알려져 있다. 그러나 SCD2가 마우스 배아의 척수 발생에 미치는 영향에 대해서는 알려진 바가 없었다.

본 연구에서는 SCD2 유전자 결손 마우스 배아에서 척수의 운동 신경 마커인 Hb9, Lhx3, Foxp1, Isl1/2와 연합 신경 마커인 Chx10이 감소하는 것을 확인하였다. Chick 배아에서도 척수 신경관에 *in ovo*

electroporation을 통해 chick SCD를 억제시킨 결과 운동 신경 마커인 Hb9이 감소하였다. 또한, SCD2 유전자 결손 마우스에서 운동 신경 세포의 선조 도메인인 pMN의 마커인 Olig2도 감소하였으며, SCD2 유전자 결손 마우스의 전체 몸 크기와 척수 크기 역시 대조군 마우스 대비 감소하였다. 반면, chick 배아에서 SCD2의 획득형질을 확인해봤을 때는 큰 차이를 보이지 않았다. 이를 토대로 SCD2 유전자 결손 마우스의 10.5일째 배아부터 12.5일째 배아까지 active caspase-3의 증가를 관찰하였고, 그 결과 특히 12.5일째 배아는 이전 배아들(10.5일부터 12일) 대비 꼬리 쪽이 더 크게 증가한 것을 볼 수 있었다. Chick 배아에서도 척수 신경관에서 SCD를 억제시켰을 때 active caspase-3가 증가한 것을 확인하였다. 이러한 결과로 보아 SCD2 유전자 결손 모델의 척수 발생이 억제되었고, 그 원인은 active caspase-3의 증가로 인한 세포 예정사(apoptosis)라고 판단하였다.

또한, 척수의 운동 신경 발생이 진행될 때 횡격막 신경(phrenic nerve) 역시 분화가 이루어지는데, SCD2 유전자 결손 마우스 배아의 횡격막에서 횡격막 신경의 분지가 감소하고 신경근연접(neuromuscular

junction)의 수도 감소한 것을 확인하였다.

결론적으로, 위의 결과에 기반하여 SCD2가 배아의 척수 신경 발생을 위한 필요 요인으로 작용함을 입증하였다.

주요어: SCD2, 세포 예정사, 척수, 배아 발생

학번: 2017-27558

목 차

초 록.....	1
목 차.....	4
List of Abbreviations	5
List of Figures	6
I. 서 론.....	7
II. 실험 방법	10
III. 실험 결과	14
IV. 결론 및 고찰	33
V. 참고문헌.....	37
Abstract	44

List of Abbreviations

BTX	Bungarotoxin
HH	Hamburger–Hamilton stage
IF	Immunofluorescence
IHC	Immunohistochemistry
ISH	<i>In situ</i> hybridization
KO	Knock out
MN	Motor neuron
NF	Neurofilament
PFA	Paraformaldehyde
pMN	Motor neuron progenitor domain
SC	Spinal Cord
WT	Wild Type

List of Figures

- Figure 1** Expression of SCD2 showed in progenitor domain and motor neuron region of mouse embryonic spinal cord and the size difference between SCD2 KO mouse and control.
- Figure 2** The deletion of SCD2 cause the reduction of motor neuron, and V2a interneuron
- Figure 3** The deletion of SCD2 cause the reduction of pMN domain but not at other progenitor domains
- Figure 4** The SCD2 associates to the apoptosis in spinal cord
- Figure 5** Gain of function of SCD2 showed no effect in spinal cord
- Figure 6** Loss of function of SCD2 showed no effect in proliferation at spinal cord
- Figure 7** The number of neuromuscular junction, and the number of branches of phrenic nerve reduced at SCD2 knockout mouse embryo than control

I. 서론

Stearoyl-CoA Desaturase 2는 마우스의 4가지 SCD 동위체 중 하나로, SCD1 다음으로 많이 알려져 있다. SCD2는 마우스의 배아 발생에 중요한 SCD 동위체로 알려져 있으며(Miyazaki et al. 2005), 과거에는 SCD2가 뇌에서만 유일하게 발현하는 것으로 알려져 있었으나(Kaestner et al. 1989; DeWillie and Farmer 1992) 이후 중추신경계 뿐 아니라 피부, 이자, 폐, B 림프구, 난소, 정소 등 신체 전반적으로 발현하고 있음이 밝혀졌다(Sampath and Ntambi 2011a, b; Swick and Lane 1992; Saether et al. 2003). 그러나 SCD2가 이러한 기관 조직에서 하는 역할에 대해서는 알려진 바가 많은 반면 중추신경계, 특히 척수에서의 역할에 대해서는 정확히 알려진 바가 없다. 사람의 SCD는 총 2개로, 그 중 hSCD1이 마우스의 4가지 동위체와 유전적으로 83% 유사하다. 특히, hSCD1은 SCD1, SCD2와 기능적으로도 매우 유사하다(Miyazaki et al. 2005).

SCD는 주로 *de novo* lipogenesis에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(Miyazaki et al. 2005), 주 기능은 다중불포화지방산(Polyunsaturated fatty acid, PUFA)을 전환하여 단일불포화지방산(Monounsaturated fatty acid, MUFA)으로 합성시키는 것이다. 이때 주로 이용되는 다중불포화지방산은 Palmitoyl-CoA와 Stearoyl-CoA인데,

특히 palmitoyl-CoA는 Wnt 단백질을 활성화시킬 때 결합되는 기질로 이용된다(Rios-Esteves et al. 2013).

SCD는 지질 대사에서 중요한 효소로 작용하기 때문에, 지방산의 영향을 받는 amyotrophic lateral sclerosis(ALS), spinal muscle atrophy(SMA) 등 여러 운동 신경 질환에서도 중요한 역할을 담당할 가능성이 있다(Schmitt, Florent, et al. 2014). 따라서, 본 연구는 SCD2와 척수의 발달, 특히 운동 신경의 분화에 초점을 맞추어 진행되었다.

척수 중 배쪽 척수(ventral spinal cord)는 초기 발달 과정에서 전구 세포 영역이 여러 개 존재하고 특정 영역에서 각기 다른 신경 세포로 분화된다(Jessell, 2000). 전구 세포 영역 중 pMN 영역은 추후 운동 신경으로 분화가 일어나는 부위이다(Ravanelli and Appel, 2015; Zhou and Anderson, 2002). pMN에서 분화가 시작되면 새로 분화된 운동 신경 세포는 전사 인자 Lhx3와 Foxp1의 영향을 받아 각 운동 신경 내에서도 여러 칼럼으로 나뉘게 된다. Lhx3가 지배적으로 발현되면 운동 신경 세포는 내측 운동 칼럼(Medial Motor Column, MMC)의 한 세포로 결정되어 후에 축상면 근육(axial muscle)으로 진행된다. 반대로 Foxp1이 지배적이면 외측 운동 칼럼(lateral motor column, LMC)으로 결정되어 후에 팔다리 근육(limb muscle)으로 진행된다.

본 연구에서는 SCD2가 척수 발달의 초기 과정에 관여한다는 가정 하에 표현형 관찰이 선행되었다. *In vivo* 실험으로 마우스와 chick 배아를 동시에 관찰한 결과, 흥미롭게도 SCD2가 결여된 마우스의 척수에서 세포 예정사가 증가하였고, 이로 인해 pMN 영역이 감소하여 운동 신경과 연합 신경의 수가 감소한 것을 볼 수 있었다. 또한, *Scd2*를 chick 배아의 신경관에서 과하게 발현시키거나 chick *SCD*를 shRNA로 knockdown 시켰을 때 척수 내 발현 양상 차이와 SCD2 결여 시 횡격막 신경에서 나타나는 양상도 확인하였다.

결론적으로, 본 연구를 통해 SCD2가 척수의 전구 세포 영역과 그로부터 분화되는 운동 신경에 미치는 생리학적 영향에 대해 알 수 있으며, 이는 SCD2가 운동 신경 질환 연구에서 지니는 중요성을 시사하기도 한다.

II. 실험 방법

1. 실험 동물

C57BL/6J 계통의 SCD2 유전자 결손 마우스(The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA)는 서울대학교 약학대학 종합약학연구소의 실험동물실에서 관리하였다. 실험에 필요한 배아는 표준형 마우스와 SCD2 유전자 결손 마우스 간 교배나 SCD2 유전자 결손 마우스 간 교배로 획득하였다.

2. 계란 전기 천공법(*In ovo* Electroporation), 면역조직화학법(Immunohistochemistry assays, IHC), 제자리 부합법(*In situ* Hybridization, ISH)

HH stage 13 닭 배아의 신경관에 DNA를 주입하고 전기 천공법(electroporation)을 실행하였다. 그 후 37℃에서 48시간 동안 배양한 후 닭 배아의 척수를 분리해내어 4% PFA(paraformaldehyde)로 4℃에서 2시간 고정시킨 다음, 1X PBS로 하루 동안 워싱하였다. 다음 날 OCT에 넣어 동결 보존하였다. Cryostat 기계를 이용하여 IHC용으로는 두께 10~12μm, ISH용으로는 15~18μm으로 조직을 절단하였다.

면역조직화학법 중에서도 면역형광법 (Immunofluorescence, IF)을 이용하였으며, 사용된 항체들은 다음과 같다;

Chicken anti-beta galactosidase (Abcam, ab9361)

Guinea pig anti-Hb9 (homemade), guinea pig anti-Chx10 (homemade)

Mouse anti-Pax6 (DSHB), mouse anti-Nkx2.2 (DSHB, 74.5A5), mouse anti-Hb9/MNR2 (DSHB, 5C10), mouse anti-HA (Covance), mouse anti-Phosphohistone H3 (CST, 9706), mouse anti-Nkx6.1 (DSHB, F55A10), mouse anti-BrdU (Sigma, BU-33)

Rabbit anti-Lhx3 (Abcam, ab14555), rabbit anti-Foxp1 (Abcam, ab16645), k5 rabbit anti-Isl1/2 (Jessell Lab), rabbit anti-Gata3 (homemade), rabbit anti-Olig2 (Abcam, ab15328), rabbit anti-Sox2 (Abcam, ab97959), rabbit anti-Cleaved caspase 3 (CST, 9706), mouse anti-NeuN (Millipore, MAB377), rabbit anti-Neurofilament (Millipore, Ab1987), anti-Bungarotoxin FITC conjugated

제자리 부합법에 쓰인 dioxigenin-labeled RNA probe들은 mouse *SCD2*, *Dbx1*의 cDNA를 pBluescript 벡터에 클로닝하였다.

3. DNA constructs

Chick 신경관에서 mouse SCD2의 과발현을 확인하기 위해 HA가 표지되어있는 pCS2 벡터에 mouse SCD2를 클로닝하여 msSCD2HA/pCS2를 생성하였다.

또한, chick 신경관에서 SCD2의 발현 억제 실험을 위해 P-silencer 벡터에 chick SCD의 shRNA construct를 클로닝하여 shRNA-chick SCD를 생성하였다(여수정 박사가 생성)

4. 면역블롯법(Immunoblotting assay)

12.5일째 되는 배아 중에서 표준형과 SCD2 유전자가 결손된 배아들의 척수를 각각 분리하여 lysis buffer (20mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 % NP-40, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 2 mM PMSF, 10% Glycerol, 4 mM Na₃VO₄, 200 mM NaF, 20 mM Na-pyroPO₄, and protease inhibitor cocktail)에 넣어 sonication을 통해 lysate를 생성하였다. 해당 lysate를 면역 블롯법을 이용하여 rabbit α-cleaved caspase 3 항체로 발현 정도를 확인하였다.

5. TUNEL Assay

동결 보존된 척수 조직을 절단하여 슬라이드 글라스에 붙이고 4% PFA에 고정시킨 후 Roche사의 *in situ* cell death kit, fluorescein을 이용하여 형광 신호를 확인하였다. 대조를 위해 세포 사멸을 유도한 양성 대조군과 아무것도 처리하지 않은 음성 대조군을 만들어 함께 확인하였다.

6. 횡격막 조직 분석법 (Diaphragm analysis)

18~18.5일째 되는 마우스 배아를 유전자형별로 harvest하여 몸통만 잘라 횡격막을 채취하였다. 횡격막을 2% PFA로 고정시킨 후, goat serum으로 blocking하고 rabbit α -NF로 staining하였다. 그 다음, 2차 항체 α -rabbit Alexa 594로 염색하고 그 후에 FITC로 conjugate된 α -BTX으로 염색하였다. 염색이 완료된 횡격막은 커버 슬립 두 장 사이에 넣고 mounting medium을 떨어뜨려서 고정시켰다.

7. 통계처리방법 (Statistical Analysis)

Student' s t-test를 이용하여 실험을 진행한 그룹들 간의 유의성을 측정하였고, 이는 평균과 표준 오차로 표기하였다. 통계적 유의성은 *는 $P<0.05$, **는 $P<0.01$, ***는 $P<0.001$ 를 기준으로 표기하였고, NS는 $P>0.05$ 로 유의하지 않음을 나타낸다.

III. 실험 결과

1. 척수 발달 과정 중 전구 세포 영역과 운동 신경 세포 영역에서 SCD2의 발현

Stearoyl-CoA Desaturase 2는 성인에서도 발현하지만 중추신경계와 마우스의 배아 발생에 특히 중요한 SCD 동위체로 알려져 있다 (Miyazaki et al. 2005). 본 실험에서는 SCD2의 역할을 이해하기 위해 먼저 SCD2 유전자를 제거한 KO 마우스의 척수에서 SCD2의 발현 양상을 확인해보았다.

WT 마우스 배아와 SCD2 KO 마우스 배아의 척수에서 SCD2 RNA probe를 이용하여 제자리부합법 (*In situ* hybridization, ISH)을 시행하였다. 그 결과 마우스 E10.5와 같은 초기 배아 단계에서부터 전구 세포 영역과 운동 신경 세포 영역에서 SCD2가 높게 발현하는 것을 확인하였고 그 이후로 E12.5까지 동일한 영역에서 SCD2의 발현 정도를 확인하였다. 그에 반해 SCD2 KO 마우스에서는 그러한 SCD2의 발현이 전혀 관찰되지 않은 것으로 보아 유전자 조작이 잘 이루어진 것을 알 수 있었다 (Fig 1A, B). 이러한 양상에 기반해, SCD2는 전구 세포와 운동 신경 세포의 발달에 영향을 미칠 수 있다고 가정하였다.

다음으로, E10.5부터 E12.5까지 모든 SCD2 KO 마우스가 WT 대비 전

반적인 몸의 길이와 척수의 크기가 작은 것으로 나타났다. 이러한 형태학적 표현형의 변화는 SCD2 유전자의 대립유전자 중 한 쪽이 사라질수록 점차 줄어드는 것을 볼 수 있었다. 단적으로 SCD2 헤테로의 경우, 몸의 크기가 WT보다는 작지만 KO 마우스보다는 약간 큰 것을 확인하였다(Fig 1C).

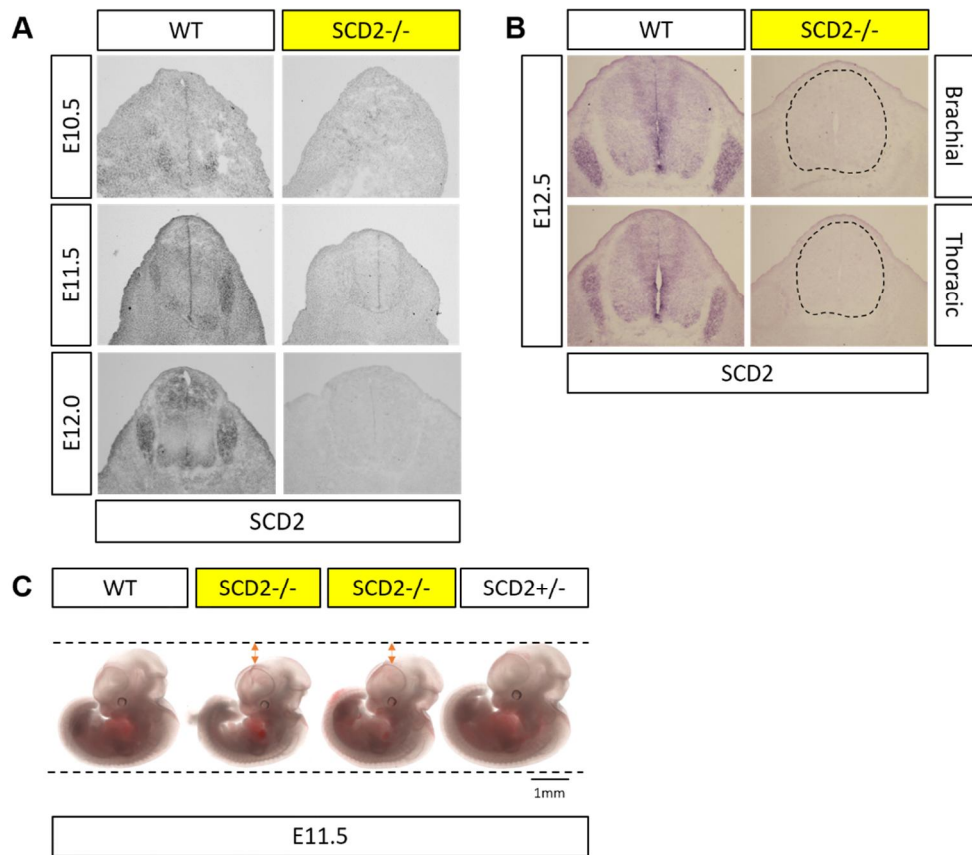


Figure 1. Expression of SCD2 showed in progenitor domain and motor neuron region of mouse embryonic spinal cord and the size difference between SCD2 KO mouse and control.

(A) Expression pattern of SCD2 in E10.5 through E12.0 mouse spinal cord. SCD2 is expressed in progenitor domain, and motor neuron region in spinal cord.

(B) Expression pattern of SCD2 in E12.5 mouse brachial and thoracic of spinal cord by ISH. Also the comparison of size of the spinal cord between WT and KO mouse.

(C) Comparison of the body size between WT, SCD2 KO and HT mouse.

2. SCD2 결여로 인한 척수 운동 신경 및 V2a 연합 신경의 감소

SCD2의 발현이 전구 세포 영역과 운동 신경 영역에서 주로 나타났기 때문에 실제로 이 두 영역의 신경 전사 인자들은 어떻게 변화했는지 알아보려고 하였다. 운동 신경은 분화가 일어남에 따라 전사 인자들이 발현하는 위치가 달라지며 칼럼이 결정되기 때문에 SCD2가 제거되면 칼럼의 구획이 달라질 수 있다고 가정하였다. 먼저 E12.5 마우스에서 운동 신경의 대표적인 전사 인자인 Hb9과 내측 운동 칼럼(medial motor column, MMC)의 전사 인자 중 하나인 Lhx3를 co-staining한 결과, SCD2 KO 마우스에서 전사 인자들의 수와 전체 MMC 넓이가 감소한 것을 확인하였다(Fig 2A). 또한, SCD2 KO 마우스에서 외측 운동 칼럼(lateral motor column, LMC) 외측 LMCI(lateral)의 전사 인자인 Foxp1과 Hb9의 수도 감소하고, 몸통 측 아래 운동 칼럼(hypaxial motor column, HMC)의 전사 인자인 Isl1/2와 Hb9의 수도 감소하였다(Fig 2B, C). 이로써 처음 가정과는 달리 SCD2가 제거되었을 때 운동 신경의 칼럼 구획이 일어나기 전에 전반적이 신경 세포의 감소가 일어난다는 것을 확인하였다.

V2a 연합 신경의 전사 인자인 Chx10과 Lhx3 역시 SCD2 KO 마우스에서 감소하였다(Fig 2D). 실험을 진행한 SCD2 유전자 조작 마우스의 경우에는 특정 부위만이 아닌 전반적으로 유전자가 결손됐기 때

문에 척수 특이적으로 SCD2 억제 시 유사한 표현형을 나타내는지 보고자 하였다. 따라서 Chick 배아의 신경관에 shRNA를 이용하여 chick SCD을 억제시키는 실험을 진행하였고, 그 결과 마우스 실험에서와 마찬가지로 sh-ckSCD를 주입한 부분에서만 Hb9이 감소하였다(Fig 2E). 이를 통해 운동 신경 칼럼뿐 아니라 V2a 연합 신경에서도 전사 인자의 수와 범위가 감소했음을 확인하였다.

다음으로는 전구 세포 영역의 전사 인자들을 살펴보았다. 전구 세포 영역에서도 P0 영역에서 주로 발현되는 Dbx1을 ISH를 통해 확인해본 결과 유의미한 차이는 발견되지 않았다. P3 영역에서 발현되는 Nkx2.2와 P0에서 pMN 영역까지 발현되는 Pax6에서도 동일하게 변화가 없는 것으로 나타났다(Fig 3A). 그러나 pMN에서 주로 발현하는 Olig2는 SCD2 KO 마우스에서 감소하는 것을 확인하였다(Fig 3B, C).

결론적으로, 운동 신경 세포의 전구 영역인 pMN에서부터 전사 인자의 발현이 감소하기 때문에 운동 신경 세포로 분화된 이후에도 전사 인자가 더 적게 관찰된다고 할 수 있다.

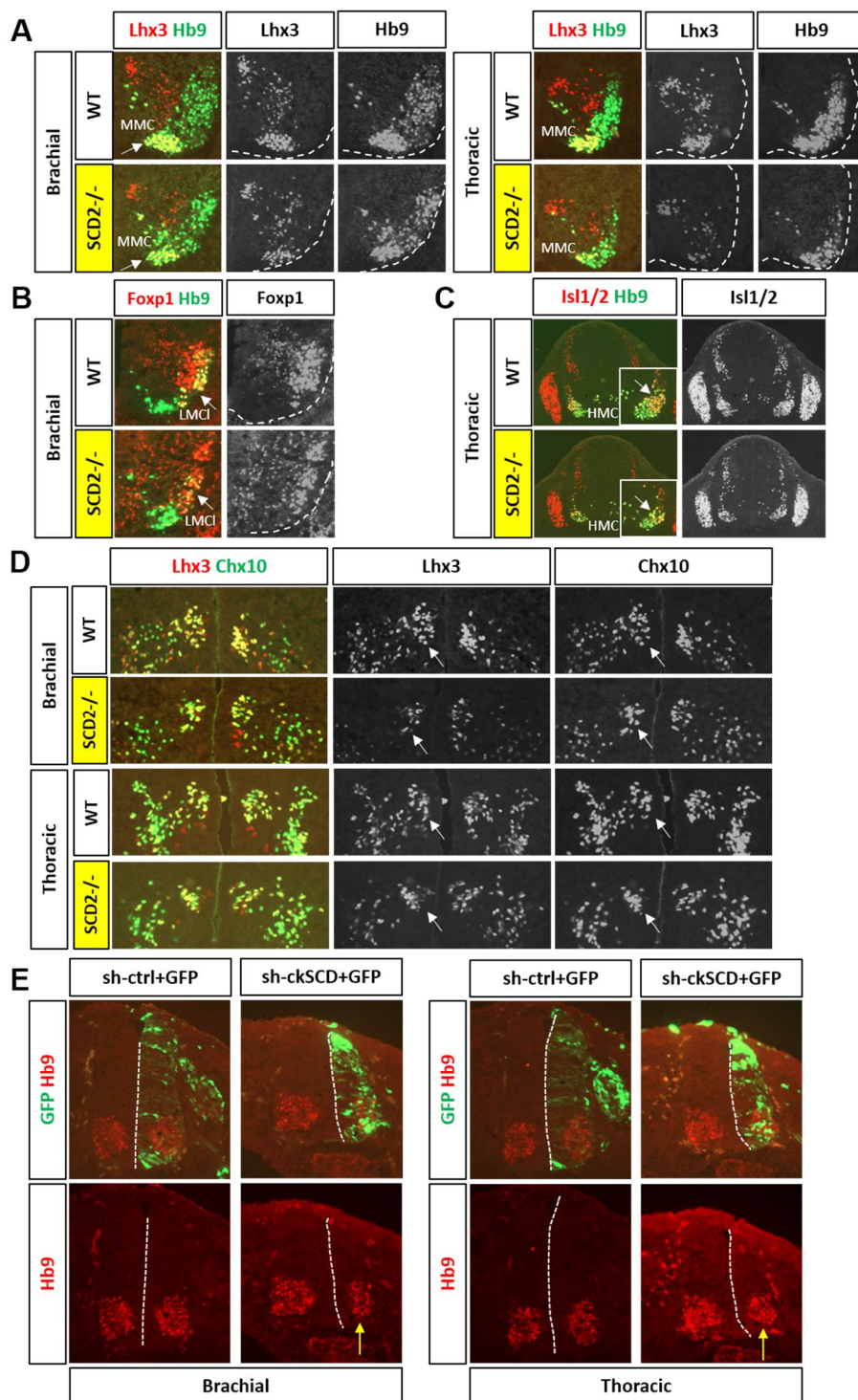


Figure 2. The deletion of SCD2 cause the reduction of motor neuron, and V2a interneuron

- (A) The expression of Hb9, and Lhx3 reduced and the width of MMC also decreased in SCD2 KO mouse compared to WT.
- (B) The number of Hb9, and Foxp1 reduced and the width of LMCI also decreased in SCD2 KO mouse compared to WT.
- (C) The width of HMC decreased and the expression of Hb9, and Isl1/2 reduced in SCD2 KO mouse compared to WT.
- (D) Both Chx10+ and Lhx3+ cells are all reduced in SCD2 KO mouse, that the region of V2a interneuron also decreased.
- (E) sh-ckSCD was injected in neural tube of chick embryo, the injected side showed reduction of Hb9 than the control.

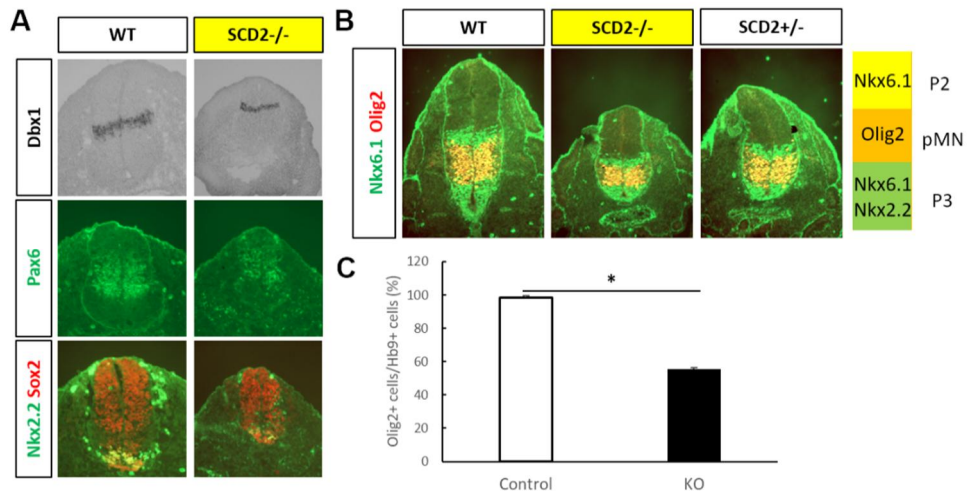


Figure 3. The deletion of SCD2 cause the reduction of pMN domain but not at other progenitor domain

(A) (A) No difference shown in transcription factors for P0 through pMN and P3 domains.

(B) The expression of Olig2 reduced in SCD2 KO mouse than control.

(C) Quantified data shown for the ratio of Olig2⁺ cells to Hb9⁺ cells.

3. SCD2의 결여로 인한 신경 세포의 세포 예정사

SCD2가 결여된 마우스에서 pMN 영역의 전사 인자와 운동 신경의 전사 인자들이 줄어드는 것을 확인한 후, 이 현상이 세포 예정사 (apoptosis)의 결과인지 알아보았다. 먼저, 세포 예정사 경로의 가장 마지막에서 집행자 역할을 하는 caspase-3의 활성화된 형태인 cleaved caspase-3를 IF로 척수 조직에서 확인해보았다. 흥미롭게도 SCD2가 결여된 마우스에서 cleaved caspase-3가 폭발적으로 증가한 것을 볼 수 있었다. 이 현상은 E10.5에서부터 E12.5까지 일관적으로 나타났다. 특이한 점은, E12.5의 척수에서는 상층(rostral)에서보다 꼬리 쪽 (caudal)에서 cleaved caspase-3의 수가 더 많은 것을 확인하였다(Fig 4A, B). 이는 척수의 상층에서부터 발달이 시작되고, E12.5에서는 발달이 거의 다 이루어진 것이 원인이라고 가정하였다. Cleaved caspase-3 증가를 더욱 확실시키기 위해 WT과 SCD2+/- (헤테로), KO 유전자형 별로 E12.5 마우스의 척수를 각각 분리하여 lysate를 생성한 결과, caspase-3가 감소한 것을 확인하였다(Fig 4C). 그 후, Cleaved caspase-3 증가 원인이 실제로 신경 세포에서의 세포예정사인지를 확인하기 위해 TUNEL assay와 a-NeuN의 IF를 시행하였다. TUNEL assay 결과, SCD2 KO 마우스에서 형광 신호가 증가한 것을 볼 수 있었고, a-Cleaved caspase-3와 a-NeuN을 처리하여 IF를 확인하였을

때 둘 다 동일한 부분에 위치한 것을 보아 신경 세포에서 세포 예정사가 발생했다고 확신할 수 있었다(Fig 4D). 이러한 표현형이 척수 특이적인 지 확인하기 위해 chick 배아의 신경관에 sh-chick SCD를 주입하였더니 주입한 영역에서만 cleaved caspase-3가 증가하였다(Fig 4E).

결론적으로, 위의 실험 결과를 통해 SCD2가 신경 세포의 세포 예정사를 유도한다는 것을 알 수 있다.

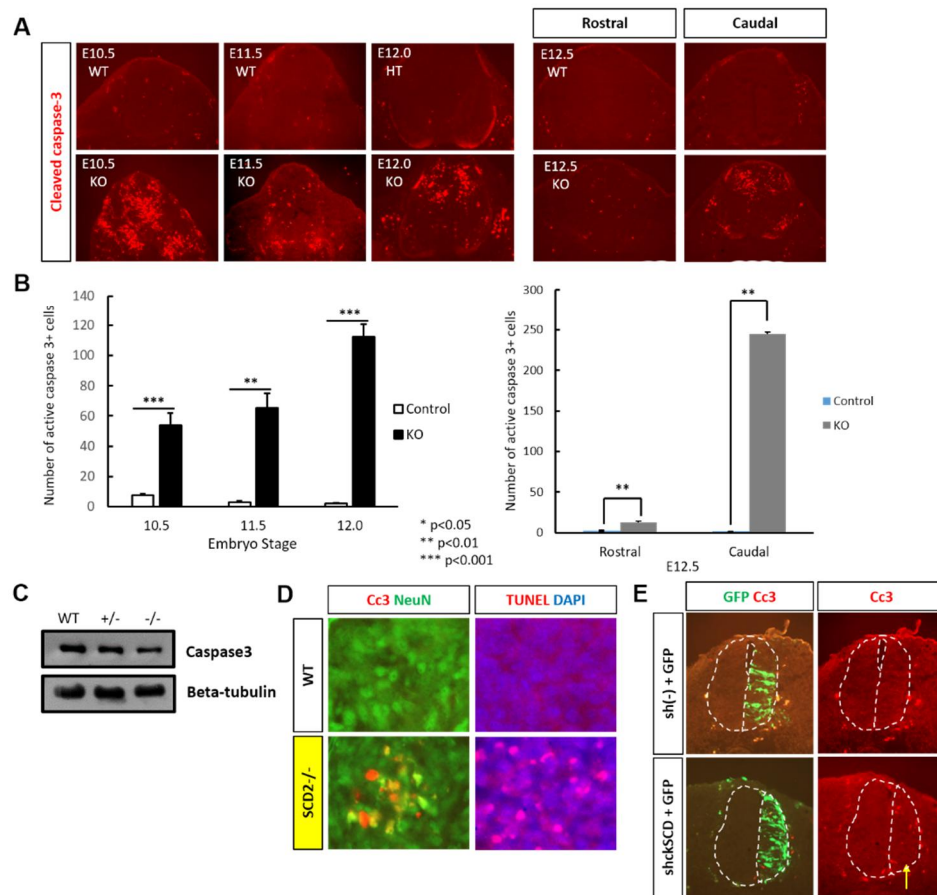


Figure 4. The SCD2 associates to the apoptosis in spinal cord

(A) The expression of cleaved caspase-3 significantly increased in SCD2 KO mouse from E10.5 to E12.5. Observation at caudal level from E10.5 to E12.0, and both rostral and caudal level at E12.5 mouse.

(B) Quantification data of number of cleaved caspase-3⁺ cells in spinal cord.

(C) E12.5 spinal cord was isolated and made to lysate. Proform of

caspase-3 protein level decreased at SCD2 KO mouse. Beta tubulin used for control to normalize the level of protein.

(D) Immunofluorescence with α -NeuN, and α -cleaved caspase-3 in spinal cord. Also TUNEL assay result in spinal cord E12.5 mouse.

(E) shRNA of ckSCD was injected in chick neural tube. The injected side showed increased cleaved caspase-3.

4. 척수 내에서 신경 세포 분화에 작용하는 SCD2의 역할 (Gain, and Loss of Function)

척수 특이적이게 SCD2의 역할에 대해 알아보기 위해, chick 배아를 이용하여 실험을 진행하였다. Chick 배아의 신경관에 shRNA를 이용하여 chick SCD를 억제시킨 결과, SCD2 KO 마우스의 표현형과 유사하게 주입한 곳은 척수의 크기와 운동 신경 세포 전사 인자인 Hb9의 발현 정도가 감소하였다(Fig. 2E). 세포 증식의 변화를 관찰해 보기 위해 phosphohistone H3의 발현을 확인한 결과, 감소했을 것이라는 예상과 달리 어떠한 변화도 관찰되지 않았다(Fig 6A). 또한, S phase를 감지하는 BrdU의 발현 역시 큰 차이를 보이지 않았다(Fig 6B).

이는 Chick 배아의 신경관에 HA가 붙어있는 SCD2를 주입하여 기능을 획득하게 하였을 때의 결과와 유사하다. SCD2의 기능을 획득하게 하는 실험을 진행하고 동일하게 pH3와 BrdU의 발현 정도를 확인한 결과, 세포 증식에서 큰 차이를 보이지 않았고, cleaved caspase-3의 발현 역시 변화가 없었다(Fig. 5B). 뿐만 아니라, 운동 신경 세포의 전사 인자인 Hb9의 발현 정도에도 큰 차이가 나지 않았다(Fig. 5A). SCD2의 결여로 인해 세포 예정사가 증가하였지만 세포 증식에는 큰 영향이 없었으므로 발달 과정 중 SCD2의 역할은 세포 증식이 발생하는 기작과는 별개라고 이해할 수 있다.

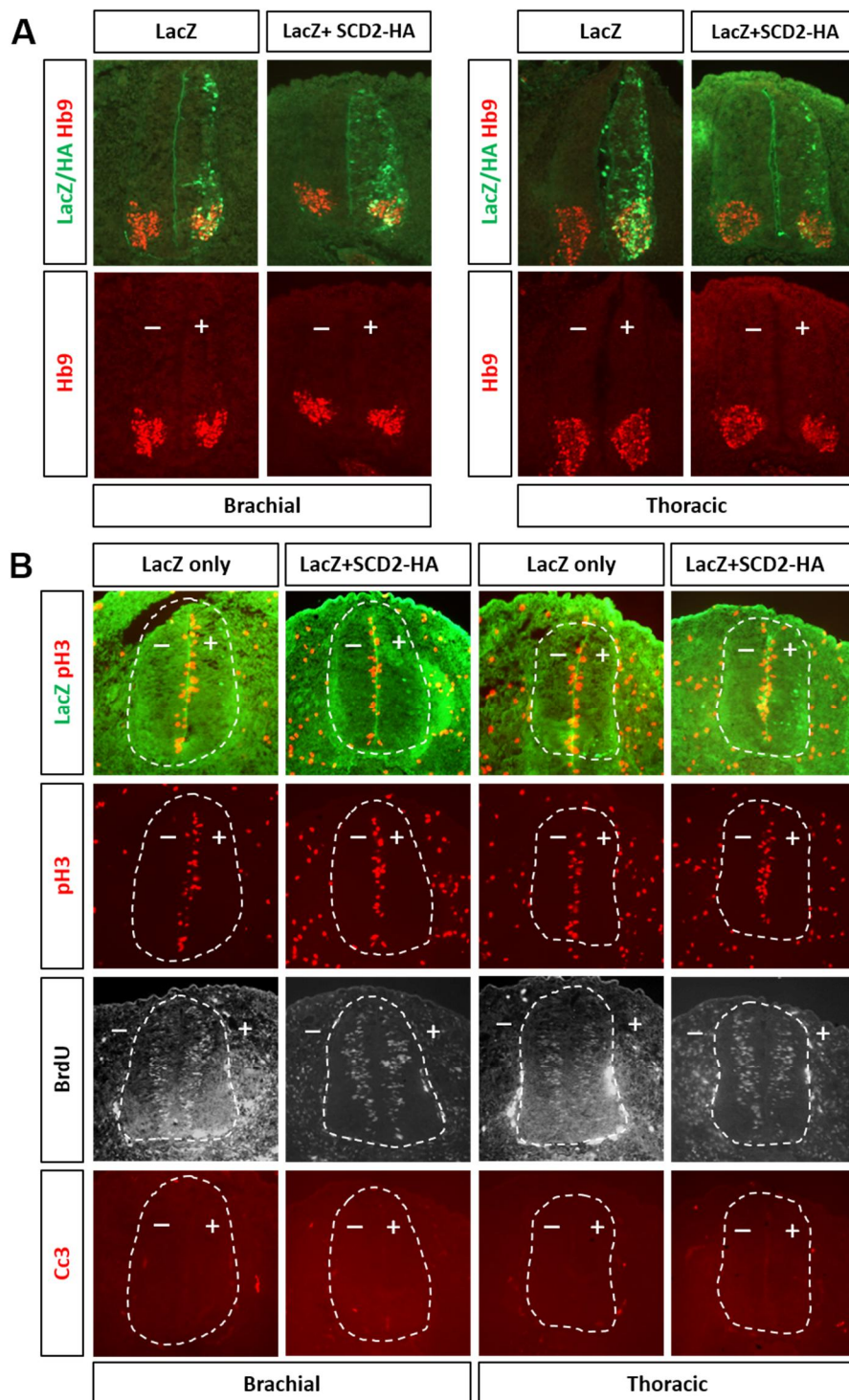


Figure 5. Gain of function of SCD2 showed no effect in spinal cord

(A) HA tagged SCD2 inserted pCS vector was injected to neural tube of HH stage 13 chick embryo. No difference showed with expression of Hb9.

(B) No significant change showed in both proliferation and apoptosis after injection of HA tagged SCD2 in chick embryo neural tube. α -pH3 and α -BrdU was used to confirm proliferation.

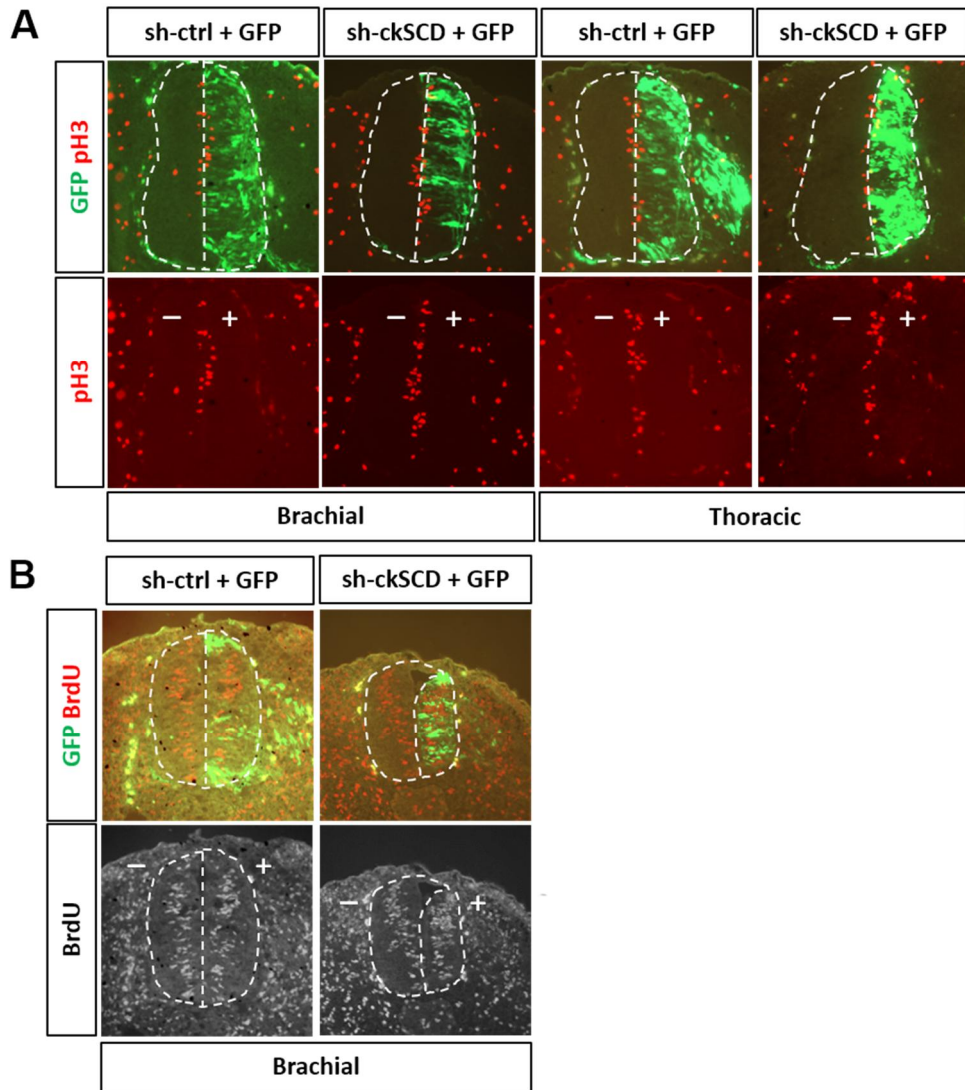


Figure 6. Loss of function of SCD2 showed no effect in proliferation at spinal cor

(A) shRNA of ckSCD was injected with GFP in neural tube of chick embryo. No difference showed between shRNA injected and control. a-pH3 used for showing proliferation.

(B) a-BrdU used for showing proliferation especially S phase.

5. 횡격막 신경의 분화 과정에서 SCD2의 관여

운동 신경은 운동 신경 전구 세포 영역인 pMN에서 분화하는데 그 중 일부는 횡격막 신경(phrenic nerve)으로 분화한다(Rousso, David L. et al. 2008). 그간의 연구 결과에 의하면, SCD2 결여 시 운동 신경 세포와 그의 전구 세포 영역에서 세포 예정사가 많이 발생하며 동시에 전사 인자의 수는 감소한다. 이 때, 횡격막 신경 역시 감소할 것이라는 가정 하에 실험을 진행하였다. 먼저, E18.0 마우스에서 횡격막을 분리하고 전체를 고정하여 형광 염색을 하였다. 횡격막의 크기는 SCD2 KO이 더 작았고, 형광 염색 후 관찰한 결과 횡격막 신경의 분지 수도 더 적었다(Fig 6A). 뿐만 아니라 신경근연접의 수도 감소한 것을 확인하였다(Fig 6B). 이는 초기 발달 과정 중에 전체 몸의 크기와 횡격막 크기의 이상이 발생했으며, 더불어 척수 전구 세포 영역에서 횡격막 신경으로의 분화 이상이 생겼음을 의미한다. 이러한 신경 발달 이상은 SCD2가 척수의 운동 신경 전구 세포에서 횡격막 신경으로 분화하는 과정 중에 작용하여 정상적인 분화가 일어나지 못해 발생한 것으로 생각된다.

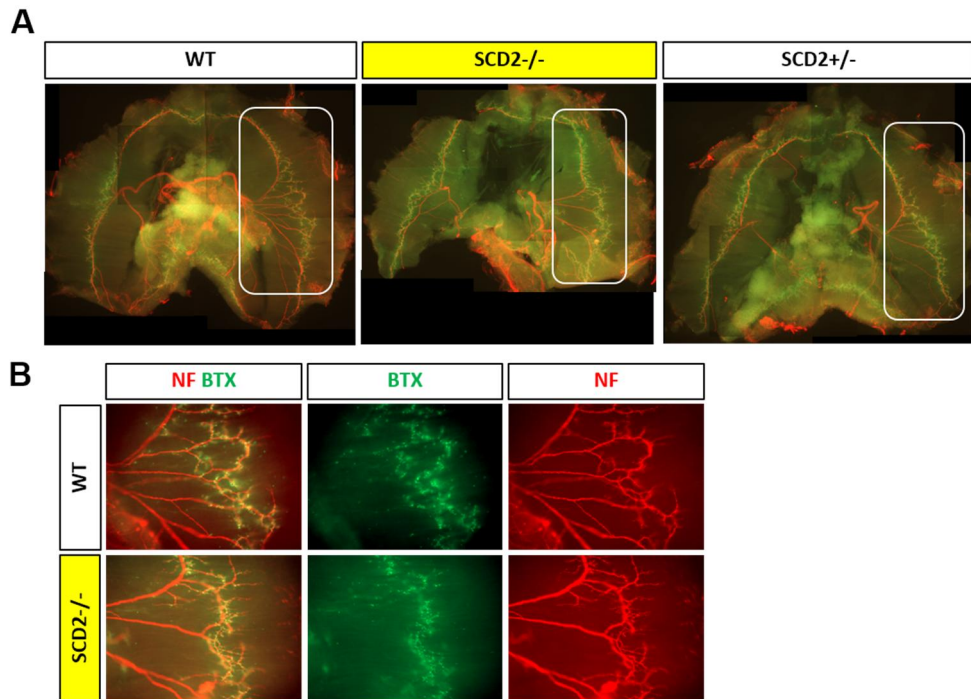


Figure 7. The number of neuromuscular junction, and the number of branches of phrenic nerve reduced at SCD2 knockout mouse embryo than control

(A) Diaphragm analysis in E18.0 mouse. SCD2 KO mouse showed less branches of phrenic nerve than control. α -Neurofilament(NF) was used to show phrenic nerve.

(B) Magnified data of diaphragm. The phrenic nerve and neuromuscular junction of SCD2 KO mouse showed less than control. α -Bungarotoxin(BTX) was used to show neuromuscular junction.

IV. 결론 및 고찰

척수 발달 과정이란 특정 전사 인자들이 전구 세포 영역에서 여러 신경 세포로 분화되는 과정을 지칭한다. 따라서, 전구 세포 영역에서부터 분화에 문제가 발생하면 운동 신경이나 연합 신경 등으로 정상적인 분화가 일어나기 어렵다. 본 연구에서는 Stearoyl-CoA desaturase 2가 배아 초기 단계에 척수의 운동 신경 전구 세포 영역(pMN)과 여러 종류의 신경으로 분화하는 데에 영향을 미친다는 것을 밝혔다. 또한, 세포 예정사에 영향을 미친다는 것을 밝혔다. *In vivo* 실험으로 SCD2를 제거시킨 유전자 변형 마우스를 이용한 결과, 유전자 변형 마우스의 척수 크기가 WT 대비 현저하게 작았으며(Fig 1), pMN 영역에서 그 전사 인자가 감소한 것을 확인하였다(Fig 3). 이로 인해 운동 신경 세포의 수와, 이를 유전자 수준에서 조절하는 전사 인자들인 Hb9, Lhx3, Foxp1, Isl1/가 감소하였다(Fig 2). 이러한 현상은 운동 신경에서만 발견된 것이 아니라 V2a 연합 신경에서도 나타났는데, V2a 연합 신경의 전사 인자인 Chx10의 발현 정도도 감소하였다(Fig 2). 이러한 결과는 세포 예정사(apoptosis)의 발현 증가로 인한 것으로 생각하였다. SCD2 KO 마우스의 척수 안쪽에서는 cleaved caspase-3를 발현하는 신경 세포가 WT보다 6배 가까이 더 많음을 확인하였다(Fig 4). Stearoyl-CoA desaturase 2는 단불포화지방산(monounsaturated fatty acid, MUFA)

을 합성하는 기능이 있다 (Miyazaki et al. 2005). SCD2 효소 자체가 세포 예정사를 유도하는 데에 영향을 미치는지 혹은 SCD2로부터 합성되는 지방산이 만들어지지 못할 때 세포 예정사가 유도되는지에 대해 더 연구가 필요하다.

Chick 배아에서 shRNA chick *SCD*를 *in ovo* electroporation으로 주입한 부분에서는 Hb9의 수는 감소하고 cleaved caspase-3는 증가한 것을 확인하였다 (Fig 2E, 4E). 하지만 놀랍게도 SCD2 KO 마우스와 knockdown된 chick 모두 세포 증식과 관련된 마커에서는 변화가 없었다. 체세포 분열의 마커로 알려져 있는 phosphohistone H3(pH3)를 IF로 확인해본 결과 발현 정도에 변화가 없었고, 이는 세포 주기의 S기를 확인할 수 있는 마커인 BrdU를 이용하여 염색했을 때도 동일하게 나타났다 (Fig 6). 이 결과로 보아 SCD2는 세포 예정사를 일으키는 기작에는 영향을 미치지만 세포 증식이 일어나는 기작에는 큰 영향을 미치지 않는다고 판단하였다. 또한 SCD2를 chick의 신경관에서 과하게 발현시켜서 그 기능을 더 획득하도록 한 실험에서도 세포 증식에 큰 차이를 보이지 않았고, 더불어 세포 예정사에도 변화를 보이지 않았다 (Fig 5).

본 연구를 진행하던 중, SCD2 제거로 인해 운동 신경을 비롯한 여러 신경들의 손실이 일어나기에 횡격막 운동 신경(phrenic motor neuron)의 손실 또한 이루어졌을 것이라고 생각하였다 (Thaler,

Joshua, et al. 1999; Philippidou, Polyxeni, et al. 2012). E18.0 마우스의 횡격막을 분리해서 분석한 결과, SCD2 KO에서 횡격막 운동 신경의 분지 수와 신경근연접의 수가 감소한 것을 확인하였다 (Fig 7). C57/B6 유전자 배경의 마우스는 새로 태어난 자손의 SCD2 유전자가 결여되었을 때 100%의 치사율을 가진다고 알려져 있다 (Miyazaki et al. 2005). 그러므로 이러한 횡격막 운동 신경의 분화 이상이 치사율에 영향을 줬을 것으로 생각되었다.

또한, 앞으로 SCD2와 루게릭병을 연관 지어서 연구를 진행해 나가야한다고 생각한다. 한 연구에 따르면 단일불포화지방산이 세포 독성이 있는 SOD1 응집에 필요한 요인으로 작용한다는 결과가 있다 (Kim, Yeon-Jeong, et al. 2005). 단일불포화지방산을 합성해내는 역할을 하는 SCD가 결여되면 SOD1의 응집으로 인한 세포 독성의 정도도 약화될 것으로 생각된다. 또한, SCD는 Wnt 단백질과 연관성이 있다고 알려져 있다. SCD가 합성해내는 단일불포화지방산을 기질로 이용해서 Wnt 단백질에 붙여주면 활성을 갖게 된다(Rios-Esteves et al. 2013). 그 중에서도 canonical Wnt pathway는 루게릭병(Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS)과 연관이 있다(Chen, Yanchun, et al. *Neurological research* 34.4 2012; Chen, Yanchun, et al. *Biochemical and biophysical research communications* 420.2 2012). ALS 환자의 증상 중 하나로는 횡격막 신경의 이상으로 인한 호흡 곤란도 존재하므로

(Evangelista, Teresinha, et al. 1995) SCD2와 Wnt 단백질, 그리고 ALS가서로 연관되어 있을 것이라고 생각한다. 루게릭병뿐만 아니라 다양한 운동 신경 질환(Motor Neuron Disease, MND)에 있어서 SCD2를 다양한 측면에서 연구를 진행하면 치료제 후보로 작용할 수 있을 것이라고 생각된다.

V. 참고문헌

(1) Miyazaki, Makoto, et al. "Stearoyl-CoA desaturase-2 gene expression is required for lipid synthesis during early skin and liver development." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.35 (2005): 12501-12506.

(2) Miyazaki, Makoto, et al. "Identification and characterization of murine SCD4, a novel heart-specific stearoyl-CoA desaturase isoform regulated by leptin and dietary factors." *Journal of Biological Chemistry* 278.36 (2003): 33904-33911.

(3) Thaler, Joshua, et al. "Active suppression of interneuron programs within developing motor neurons revealed by analysis of homeodomain factor HB9." *Neuron* 23.4 (1999): 675-687.

(4) Philippidou, Polyxeni, et al. "Sustained Hox5 gene activity is required for respiratory motor neuron development." *Nature neuroscience* 15.12 (2012): 1636.

(5) Christianson, Jennifer L., et al. "Stearoyl-CoA desaturase 2 is required for peroxisome proliferator-activated receptor γ expression and adipogenesis in cultured 3T3-L1 cells." *Journal of Biological Chemistry* 283.5 (2008): 2906-2916.

(6) Hussain, Ghulam, et al. "Systemic down-regulation of delta-9 desaturase promotes muscle oxidative metabolism and accelerates muscle function recovery following nerve injury." *PloS one* 8.6 (2013): e64525.

(7) Xu, S., et al. "Palmitate induces ER calcium depletion and apoptosis in mouse podocytes subsequent to mitochondrial oxidative stress." *Cell death & disease* 6.11 (2015): e1976.

(8) Stifani, Nicolas. "Motor neurons and the generation of spinal motor neurons diversity." *Frontiers in cellular neuroscience* 8 (2014): 293.

(9) Roussou, David L., et al. "Coordinated actions of the forkhead protein Foxp1 and Hox proteins in the columnar organization of spinal motor neurons." *Neuron* 59.2 (2008): 226–240.

(10) Sefton, Elizabeth M., Mirialys Gallardo, and Gabrielle Kardon. "Developmental origin and morphogenesis of the diaphragm, an essential mammalian muscle." *Developmental biology* 440.2 (2018): 64–73.

(11) Saller, Maximilian Michael, et al. "The role of Sema3-Npn-1 signaling during diaphragm innervation and muscle development." *J Cell Sci* 129.17 (2016): 3295–3308.

(12) Lu, Daniel C., Tianyi Niu, and William A. Alaynick. "Molecular and cellular development of spinal cord locomotor circuitry." *Frontiers in molecular neuroscience* 8 (2015): 25.

(13) Lee, Bora, et al. "The LIM-homeobox transcription factor Isl1 plays crucial roles in the development of multiple arcuate nucleus neurons." *Development* 143.20 (2016): 3763–3773.

(14) Agalliu, Dritan, et al. "Motor neurons with axial muscle projections specified by Wnt4/5 signaling." *Neuron* 61.5 (2009): 708–720.

(15) Rios-Esteves, Jessica, and Marilyn D. Resh. "Stearoyl CoA desaturase is required to produce active, lipid-modified Wnt proteins." *Cell reports* 4.6 (2013): 1072–1081.

(16) Dobrzyn, A., and P. Dobrzyn. "Stearoyl-CoA desaturase—a new player in skeletal muscle metabolism regulation." *J Physiol Pharmacol* 57. Suppl 10 (2006): 31–42.

(17) Ntambi, James M., ed. *Stearoyl-CoA desaturase genes in lipid metabolism*. Springer Science & Business Media, 2013.

(18) Kikuchi, Hitoshi, et al. "Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide

dismutase-1 in an ALS model." Proceedings of the National Academy of Sciences 103.15 (2006): 6025–6030.

(19) Schmitt, Florent, et al. "A plural role for lipids in motor neuron diseases: energy, signaling and structure." Frontiers in cellular neuroscience 8 (2014): 25.

(20) Henriquez, Juan P., et al. "Wnt signaling promotes AChR aggregation at the neuromuscular synapse in collaboration with agrin." Proceedings of the National Academy of Sciences 105.48 (2008): 18812–18817.

(21) Lee, S.K., Jurata, L.W., Funahashi, J., Ruiz, E.C., and Pfaff, S.L. (2004). Analysis of embryonic motoneuron gene regulation: derepression of general activators function in concert with enhancer factors. Development 131, 3295–3306.

(22) Lee, S., Cuvillier, J. M., Lee, B., Shen, R., Lee, J. W., & Lee, S. K. (2012). Fusion protein Isl1-Lhx3 specifies motor neuron fate by inducing motor neuron genes and concomitantly suppressing the interneuron programs. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(9), 3383–3388.

(23) Jessell, Thomas M. "Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes." Nature Reviews Genetics 1.1 (2000): 20.

(24) Pierani, A., et al. "Control of interneuron fate in the developing spinal cord by the progenitor homeodomain protein Dbx1." *Neuron* 29.2 (2001): 367–384.

(25) Thaler, Joshua P., et al. "LIM factor Lhx3 contributes to the specification of motor neuron and interneuron identity through cell–type–specific protein–protein interactions." *Cell* 110.2 (2002): 237–249.

(26) Pierani, Alessandra, et al. "A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord." *Cell* 97.7 (1999): 903–915.

(27) Chen, Yanchun, et al. "Activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway is associated with glial proliferation in the adult spinal cord of ALS transgenic mice." *Biochemical and biophysical research communications* 420.2 (2012): 397–403.

(28) Chen, Yanchun, et al. "Wnt signaling pathway is involved in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis in adult transgenic mice." *Neurological research* 34.4 (2012): 390–399.

(29) Torres, Viviana I., Juan A. Godoy, and Nibaldo C. Inestrosa. "Modulating Wnt signaling at the root: Porcupine and Wnt acylation." *Pharmacology & therapeutics* (2019).

(30) Green, Christopher D., and L. Karl Olson. "Modulation of palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in pancreatic β -cells by stearoyl-CoA desaturase and Elovl6." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 300.4 (2011): E640-E649.

(31) Kaestner, Klaus H., et al. "Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase." *Journal of Biological Chemistry* 264.25 (1989): 14755-14761.

(32) DeWille, J. W., and S. J. Farmer. "Quaking phenotype influences brain lipid-related mRNA levels." *Neuroscience letters* 141.2 (1992): 195-198.

(33) Sampath, Harini, and James M. Ntambi. "The role of stearoyl-CoA desaturase in obesity, insulin resistance, and inflammation." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1243.1 (2011): 47-53.

(34) Sampath, Harini, and James M. Ntambi. "The role of fatty acid desaturases in epidermal metabolism." *Dermato-endocrinology* 3.2 (2011): 62-64.

(35) Swick, Andrew G., and M. Daniel Lane. "Identification of a transcriptional repressor down-regulated during preadipocyte differentiation." *Proceedings of the National Academy of Sciences*

89.17 (1992): 7895–7899.

(36) Sæther, Thomas, et al. "Expression and regulation of Δ^5 -desaturase, Δ^6 -desaturase, stearyl-coenzyme A (CoA) desaturase 1, and stearyl-CoA desaturase 2 in rat testis." *Biology of reproduction* 69.1 (2003): 117–124.

(37) Vangelista, Teresinha, et al. "Phrenic nerve conduction in amyotrophic lateral sclerosis." *Journal of the neurological sciences* 129 (1995): 35–37.

(38) Kim, Yeon-Jeong, et al. "Unsaturated fatty acids induce cytotoxic aggregate formation of amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutants." *Journal of Biological Chemistry* 280.22 (2005): 21515–21521.

Abstract

The role of Stearoyl-CoA Desaturase 2 in development of embryonic spinal cord

Kang, Yubin

College of Pharmacy, Pharmacology major

The Graduate School

Seoul National University

Stearoyl-CoA desaturase 2(SCD2) is the one of the isoform of mouse SCD, that it is known to be express most in central nervous system(CNS), and important to the embryonic development. However, the physiological affection of SCD2 in mouse embryonic spinal cord development is unknown. Here we investigated the relation between SCD2 and the spinal cord development by using transgenic mouse and the chick model.

The transcription factor of motor neuron such as Hb9, Lhx3, Foxp1, and Isl1/2, and the interneuron transcription factor Chx10 all reduced in SCD2 knockout mouse embryo. Knockdown model was experimented with chick embryo by *in ovo* electroporation, that we verified the reduction of Hb9 expression. Moreover, we also

confirmed the reduction of Olig2, at SCD2 knockout mouse. The whole body and spinal cord size of the SCD2 knockout mouse is much smaller than control. But when SCD2 gained function, there were no significant changes.

On this basis we observed the increased expression of cleaved caspase-3 thorough E10.5 to E12.5, especially at caudal level. This phenotype showed identical when shRNA knockdown the chick SCD in neural tube of chick embryo.

From above, we revealed that SCD2 knockout induced apoptosis and from this the spinal cord development restrained. When the generation of motor neuron initiates, the phrenic nerve generates also. We confirmed that SCD2 knockout mouse showed less branches of phrenic nerve, and reduced number of neuromuscular junction.

Through the above results, we confirmed that SCD2 is a necessary factor in the development of spinal cord nerve in embryo.

Key words: SCD2, apoptosis, embryonic development, spinal cord
Student Number: 2017-27558